

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number:

04-074198

(43)Date of publication of application: 09.03.1992

(51)Int.Cl.

C07K 7/10 // A61K 37/24 A61K 37/24 CO7K 99:00

(21)Application number : 02-186582

(71)Applicant: MATSUO TOSHIYUKI

13.07.1990 (22)Date of filing:

(72)Inventor: MATSUO TOSHIYUKI

SAGAWA KENJI MINAMINO NAOTO

# (54) SWINE DERIVED NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE (CNP-53)

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A peptide having an amino acid sequence shown by the formula [(1) and (2), (3) and (4), (5) and (6), (7) and (8) and (9) and (10) are directly bonded and cysteine residues (Cys) at the 37-position and the 53-position form S-S bonds in the molecule].

USE: An antihypertensive agent and natriuretic.

PREPARATION: For example, swine brain is extracted, finely cut, treated with boiling water for 5 minutes, deactivated with protesse, homogenized by a mixer, centrifuged, the supernatant liquid is collected, concentrated, mixed with acetone, formed precipiate is removed, the supernatant liquid is treated with a silica gel, adsorbed material is eluted, an eluted solution is concentrated, subjected to gel filtration and to treatment with a column having an immobilized antibody against atrial natriuretic peptide (ANP) and purified to give C-type natriuretic peptide (CNP).

8-880-183-898-838-812-780-142 200-258 (1) Wilson's tre-blocked that the appreciation (2) 147 \$20-\$20 - \$20-610 - \$20 - 130 | The - 130 | 310 - 150 663219 800 164-285-656-184 266-292-619-773 (\$) Eyx-Phy Elector-typ lan-829-208 [12 (\$) 1108228-Sec-Roll S-2-6(y-Rex-3): 000-08

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]



# @ 8 本 图 特 許 庁 (J P)

### **①特許出願公開**

#### ™4-74198 ◎公開特許公報(A)

Mint. Cl. 3 C 07 K 7/10 // A 81 K 37/24

庁內整理番号 激刑記号

❸公開 平成4年(1992)3月9日

ZNA ABU ACX

8318-4H 8317-4C 8317-4C

C 07 K 99:00

A

**の出 🧱** 

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全11頁)

ブタ由来新規生理活性ペプチド(CNP-58) 経発明の名称

> 第 平2-186582 粉魚

續 平2(1990)7月13日 **3** 

2 **@%** 99 300 \$ \$ \$ 個幾 期 \*\*\* 380 人 **3**3 **19** SK \*\* نود. منته

\*\*

28

大阪府美面市小野原東 5 丁目 5 -15-141 宮崎県宮崎部潜武町加納甲1520番地の24

大阪府吹田市署山台3丁目50, D-10-303 大阪府箕面市小野原東5丁目5-15-141

外系名 弁理士 湯浅 **\*** = COST THE

3、 下記のアミノ敵配列で裏わされるペプチド。

### 1. (詹姆の名称)

プタ由来新規生運需性ペプチド(C87~53)

### 2. (移物模求の難器)

- g. Asp. Lau-Arg. Vla-Asp. Thr-Lya-Ser Arg. (1) (21516-615-709-618-608-Lou-Lau-fie-610-(3) (4)8)x.pro.ken.8)z.4rg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5) (6)614-620-Lys-Lys-614-Leu-Ser-198-614-(7) (8) Cyc. Pha. Gly. Lau. Lya. Lau. Asp. Asp. 18- (9) ({Q}Q)Q(\$-\$@r.8@s.5@r.5]}r-Lev-5(\$-\$\. (素中、(1) と(2)、(3) と(4)、(5) と(8)、(7) と(8)。 (3)と(13)は直接輸合しており、37位と53位のシ 五字。少微器(Cys) は分子内で5~3輪合を形成
- 2. 下窓のアミノ最配列で汲わされるペプチド。 x.Sig.Leu.Ser-Lye-Sig-Cys.Phe-Sig.Leu-Lys-(1) (2) Lun . 25x - 21x - 21x - 20x - 20x - 20x - 21x - 10x - (3) (4)619-698-08

(成本、(()と四、凹と回は重接輪合しており、6

位と22位とのシスティン発養(むがは分子内でき -- Sで総合を影像しており、Xは次常

- g vis aspeter tra-Ser-Ara-(11)
- (\$') Ala. Ala Tra-Ala. Arg-Leu-Leu-Kis-Blu-(3')
- (4:381s-Pro-222-51s-276-L22-Tyr-Lyo-61y-(5')
- (8 )Giy-Asn-Lys-Lya- ;
- 8-Ser-Sec- (3')
- (2') Ala Ala-Tra-Ala-Ara-Lau-Lau-His-Glu-(3')
- (4) } #13-\$re-\$22-\$18-\$78-678-777-678-614-(8)
- (8'101y-Ass-Lys-Lys- :
  - 8.434.334-305.338-402-Les-Les-810-610-(5')
- (4")#12-Pro-420-410-202-145-747-242-614-(5")
- (\$')\$(y-Ass-Lys-Lys- :
  - E-Lee-Lev-His-Siv-(S')
- (4 ) His-pro-iss-his-his-his-lys-lys-lik-15° )
- (5")5)y-4ss-Lys-Lys-:
- s.fyr-lys-6ly-6ly-kan-lys-lys- : X#
- 8-61y-51y-Ass-Lys-Lys-
- (武中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(5)は2勝 数会しているものである)で表わされるいずれかの

ベブチチである)。

3、 (発売の搭載な説明)

#### **2.** 36 (2. 11. 21.

本般的は、ブタ出来でこれを(C. type satricratic peakids)に属する新規性選指性ペプチドに 関し、例に解釋には53種のアミノ機関基から成る ペプチド及びそのペプチド概義体に関する。

#### ANOXX.

近年、編集等の心態及び結から、体態及び取圧 の信用性を認知しているホルモンとして、心態性 ナトリウム利用ペプチド(strie) nationalia pepiide: 84P) と寝ナトリウム利尿作用ペプチド (breix natejoyetic peptide: 8NP) と呼ばれる 2 機能のタイプの異なるペプチドホルモン難が発見 され、その構造及び生金素機構が明らかにされる と共に、それらの生理作用についても明らかにされてきた。

ANP発展への最初の手がかりは、1981年 46 86(36)により報告された。すなわち、彼らはラットの要額独出機を他のラットの動法すると着しい

なお、これらり入れをのうちゃっち入れをが主に 窓中に分泌されていることが解っている。

 朝職を挙ずることを見いだし、心臓中にチャリウ ム利果を促進する因子が存在していることを報告 totale sold s. J. et al. life South Life. 63. 1981) 。 その後、この選挙は繋用らによりキト心 展より整整。その後数が明らかにされ、心器性す **よりウム利服ベブチド(ANP)が希急された** (Frances, E. et al. Blocker. Biophys. Sec. Commun. 118 (St. 1984: Kangawa, K. et al. Balure, 212 397, 1985) , EFANF (NAN P)は心臓において分子量の機なる3種類、する わちゅ巻、8巻、および・繋が存在しており、タ 数五人以中(カーカム以中) は分子内に1個の名 一 5 結合を有した28 編のアミノ数からなる一本報 ベッチャであること、変型おみがティカートスや P } 这四一五人以下的分子能で另一名結合を形成 した選挙行2番件であること、7型5人以下 (ナーカスガタ)は128機のアミノ酸からなる概 分子覆白質で、そのC~末端部分Cの~ h A N P を含んでいることが頼らかにされた。さらに、こ 人おりに対応するとひれるが寒難され、この解析

対する液体を作製し、生体内における分析を調べたこと、人間とは心器以外にも磁にも存在していることが概った。磁では機変下部、機械量(postice tesection) に入れる合物によっている存在が概念されていることから(Costic, 5. et al. Electropicity、側 113、1384; 3aper、C, 8. et al. Science、221 1047、1985)、人間を接触機械機能といて心能響系の調整にかかかる神経性機械機としても作用しているのではないかと考えられている。

Aが下の生態作用は前にも述べたが、需要なナトリウム制能作用を示すのみならず、自圧等下作用さらには解腎皮質のアルドステロン無性を抑制することが判ってきた。従って、現在ANPは心臓から進中に分泌され、体液及び進圧の複常性を調節するオルモンとして作用するのみならず、認ては神経系の神経伝統物質として作用し、体液及び血圧の復常性を調節していることが抑ってきた。

一方、自然をは1988年50点cbらによりて夕騒から み無難・弱定されたペプチドである(2×2×2、7、 et el. Watere. 222 TR. 1988) .

Sadoh らにより最初にブタ脳から単線されたBN ア (2587-26) は分子内は:覆の5-5続合 を終つマミノ数36残器より成るペプチドであり。 その構造、すなわちアミノ酸一次配列、及びSー S箱会様式(アミノ酸17発基で構成される魔状構 後には入れると望ているが、ANPとは頭をかに 異別されるペプチドである。 さらにこのペプチド はよれりと関機、ナトリウム刺媒作用及び選圧解 下作用を示すことが確認されたことから、このペ ブチドは綴子(とうのよ刺媒ペプチド(BNP) む お名された。その後、ブタ猫からりBNP-25の お一家海にも独のするノ難が付加した32でミノ酸 器基次可以表示 5 N P ~ 32 5 單點 5 机 (Sedob. 7. et al. Sicches. Sicesys. Res. Cossus... 135 726, 1988)、さらにはマタル男よりィーBNPと **会名されたアミノ駿186個からなるペプテドも撃** 数 - 同定されている(Missaloo, M. et al. Biaches. Biophys. Res. Commun., 137., 402, 1988) . これらの結果、これるBNPペプテド類はANP

以上をまとめると、現在までのところ権利動物においては、少なくともタイプの利分かに異なる 2 種類(ANドファミリー、BNドファミリー)のベブテド類が存在し、これらはいずれも心臓から血中に分泌され、体療及び血圧の損害性を顕彰するポルモンとして作用しているのみなるず、これらは指でも生会成され、神経系の神経伝達物質として作用し、体液及び血圧の程常性を顕新していることが到ってきた。

 2 は金(裏なった新願味から集合なされることが) 割った。さらに選在までにもト及びラット目が引 めでDNAが無難され、これらの日 ドアの新聞体 構造も明らかになっている(3250年、7、81 81: \$1000年、後1000年の、822、000年の、122、1427、 1985、2011年の、3、81 8)。 Biochem、81000年の 802、Commun. 122、1420、1889)。

財産したように、自外をは最初報より事業されたが、イタ籍において自然をは入れたなどへに信仰 量存在していること、古らには入れるとは必然 にも存在していること、古らには入れると関係必要 にも存在しくただし、必要での日かりの存在量は 入れりの2~3%)、必要から放布へ分泌されて いることが到った(Bissoles、R. からの1、810×26年、 810×20×2、845、Connect、1.252、780、1388、85×20×20、 8、まち 8)、810×20×2、1.252、780、1388、85×20×20、 272、1389)、これらの事業から、日かりは入れる と関係、職においては特殊伝統物質として、また 心臓から成布へ分泌されるホルモンとして作用し、 性種及が成正の程度性を顕彰していることが判っ た。

895), \$086, \$0), 0, 5, 8, 28, 2863, 1999). このことから、ナトリウム制爆作用を示すべてデ する理性をでは何っている人以下、日外アファミ リー以外に取るのファミリーに属するペプテド級 が存在している可能性が特たれた。この意は難し、 本義務者らは、ごく厳盗ブタ騒からナトリウム戦 袋ペプチドの袋3のファミリーに塞する新級ペプ **サドを顕微・間定することに確切し、このペプチ** Y & C N P (C-type satriaratio captida) & & 念した(段後、本発療でこのペプチドをCNPっ 23と終す)。 CNP-22はアミノ酸残萎22額から なるペプチドで、ANP・BNP筒機分子内に「 盤のS-S輪合を持つ繋状構造を形成している。 この環状構造はANP・BNPと関係にアミノ酸 務塞で構成されており、さらにこの環状構造を形 **遠しているアミノ酸一次配列の相関性はCNFー** 28とセーム以中、日NP-32の間で高い。しかし、 これを一22のこと変数数分の構造はANP・BN でのそれとは大きく異なっている。ずなむち、A NP・8NPのCー末端部分の構造は、競技構造

老器成しているシステイン機器におらに数額のア ミノ製残器が付加したいは構造を持っているのに 対し、これを一22のこ、末端は33位システィン祭 巻さあり、CNP-22はこのts:10構造が欠額して いる。これらのことから、CNP―22は構造的に スNP虫たはBNPと做ているが、これとは明み かに異なったファミリーに裏するペプテドである。 ことが残った。するに、CMP-82をラットに酵 注すると、ANP・BNPと関機にオトリウム剤 製作用及び血圧器下作用を示すこが確認されたこ とから、ONPー28は後棒内におけるナトリウム 対策ペプチとの第3のファミリーに襲する前線で プチャスをなことが報った(移職平2~105047号)。 LAL. CNY-220MCAHAMMUANP. おおとのそれに比べ締めて少ないことから、現在 のところCNP-22の生合成機構、圧体内分布及 び生産作用の評価に関しては、まだ不明な点が多

#### 

逆って、本発明では輸乳額におけるナトリウム

ッセイチェーブあたりjaci単位のこれを一22が検 出てき、ロー人れを及びられり一26に対する交叉 活性(crossresctivity) は機めて少ない。次に、 ブタの筋を水動便中でホモジネートし、得られる ベブチを相接出機がをベブチを精製に専用される 各種精製物を総合せ、前記したら 1 人を指揮に轉 製したところ、分子量的4009~5000を示すペプチ を変分から、無軽的には第3器をに示すように、 低にハター22位表達と免疫活性(janusocasctivity) を示すペプチドを、第一で純粋な状態までに精製 することに放功した。

ここで得たペプチドの構造快速は、以下に示す方法で行った。まず、このペプチドのアミノ難…次 を列をエドマン法を用いて解析したところ、第4 窓に示すように、エドマン分解により生するドア & iphenylikiahyden tois) …アスノ酸は45サイクル器まで発出、海定することができた。すなわち、この解析により、この解析で37サイクル目の下下出 制度ペプチドの第3のフォミリー、すなわちCN Pに高し、先に単載・固定したCNP-32以外の 新機ペプチドを見いだすことを当めさする。この 新機ペプチドの単数によりCNPの生合級機構。 生体内分布、きらには生産作用を明らかにするこ とに役立つと考えられる。

#### **EMANATATION**

本発明者のは、先にアタ版から単数、関定した
CMP-22の構造が人科を及び日科アファミリー
に震するペプチドの構造と明らかに残なっている
ことに複目し、CMP-22の構造を特異的に認識
する技体(CMP-22の構造は認識するが、人科
P・SMPの構造は認識しない)を作製し、この
技体を用いたランオイムノアッセイ(RIA)系
を構築することにより、このBIAを保護にアタ
の協からじ科Pファミリーに属する新級ペプテド
を見つけ出すことを計画した。

本義明では、まず化學会成したCNF-23を用い い核CNF-22飲血滑を作製し、この依律を用い てRIA某会構製した。なおこのRIAの別は7

ーアミノ酸は検出されないことから、本義明者は このアミノ数をシスティン残器(Cys) と異常した。 なお、この解析で45サイタル収象のドでリーアミ ノ酸は後出することはできたが、発定するには至 らなかった。次に、このペプチドのCー未接機強 E. UYCZ~SBESSCNP-1128-TA ると締織した。すなわち、先ず前配した方法で得 られたこのペプチャのドー末端グミノ線一次配料。 CNP-22を比較したところ、このペアチャの32 ●日から45番目さでのアミノ微一次配別は、CN 产-22のN-末端から14番目までのアミノ競一次 監察と発金に一致していることが無った。次に、 本塾明で単離したペプチドのヒヨコ原稿巡邏指指 (chick ractus relauses activity)を概定したと ころ、CNP-20と無棒な錯性を示すことが何っ た。すでにこの生物価性発現にはCys発展の分子 内S一S輪台形成に基づくアミノ難17務券よりな る器技術達が必須であることが判っていることか ち、本発明で単額したペプテドのこと来海接後に は、少なくともこの職技構造が存在していなけれ

はならない、さらは、本発剤におけるペプテドが、 CNF-22をC一末端に含む53アミノ酸機器より なるペプチドであるとするならば、本発剤におけ もペプチドの次CNF-22抗血液に対する1分子 あたりの免疫器性が、CNF-22のそれと網帯で ある事業をよく級例することができる。

後、このだNFー53においてエデマン後によって解析できなかったこ未確都分の8級のアミノ酸 関数については、ごNFー83をコードする(DNAのグローエングにより確認された(第8窓)。このクローエングに関しては義明者等の両目出版の 研報器に移送した。

以上の事実により、本発明者もは最終的に、本 発明で報酬したベアチドの構造は以下のアミノ報 一枚便利で示される新規ペアチドであると結論し た。

- x-asp-las-ses-sal-ass-Thr-lys-Ser-ars-(1)
- (3) \$ | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4 | x 4
- (()) 18 \$10-228-218-278-178-178-178-519-(5)
- (6)(3);-Asn-19s-tys-Gly-Les-ten-Lys-Gly-(?)

P-83は、アタ線においてただ単にCNP-22の 機器※ペアテトとして存在している可能性がある。 しかし、本発明の高速機で示すように、アタ線に おけるCNP-53の含盤は、CNP-22より多く 存在していることから、CNP-53はなだ無にこ ドP-22の的軽棒ペアテトとして総内に存在して いるだけでなく、CNP-53それ自身が直接能力 で体後や変圧の包含性を顕縮している可能性が高 い。

これで一53のペプチドのお家婦から31個の下を ノ機のうち塩基性アミノ酸はプロセンングを受け 思い、従って、CNター22のN末端に更にアミノ 機が付加した何週類かのペプチド機等体が生成さ れるものと考えられる。

これらのペプテド誘導体としては下窓のアミノ 搬配所で変わされるペプチド類が含まれる。

1.51y-100-30r-1y0-61y-1y0-8h0-81y-100-1y0-(1)
2010y-100-40x-11x-61y-20r-80t-30y-61y-100-(3)
4001y-670-68

「武中、田之田、田之田は素接稿会しており、8

(3) Cyn - Phe - Cly - Löu - Lyn - Leu - Asp - Arm - 11e - (8) (10) S) = - Ser - Mai - Ser - Siy - Leu - Siy - Cys - Si

(紫申、(3)と(3)、(3)と(4)、(3)と(6)、(7)と(3)。

(9) と(10)は複雑締合しておめ、37位と53位のシスティン機器(Cys) は分子内で5-5輪合を形成している。)

なが、本項報書においてこのペプラドをCNター 50と称する。

CNP-53の構造は、第5回に示すように、C 未機部分にCNP-22と同一のフェノ機配列を持っている。當い換えれば、CNP-53は先に単級 ・間定したCNP-22の形一未満に31アミノ機機 器か付加したペプチドである。さらに、CNP-53のCNP-22に対応する部分のすぐN-未満部分 分(CNP-53の33位と33位)にはいわる配列が 存在していることから(この配列に多くのペプチ ドホルモンの生会成において、新製件タンバタか ら機構ペプチドホルモンが生ずる場合のプロセッ シング酵素の認識及び物質部位であることが知ら れている)、本発明において細難・固定したCN

位と38位とのシスティン機器(Cys)は分子内で5 一名輪合を形成しており、24次式

- N. Fis. Asy-Tan-Lya-Ber-Arg-Ki X
- (2) Ala-Ala-Tra-Ala-Ara-Lev-Lau-Ala-Slu-(3)
- (4') 810 9re-Asn-Ste-Are-Lys-Tyr-Lys-Sty-(5')
- (6') Cly-Asn-Lys-Lys- :
- 8-Ser-Reg. (1')
- (2") \$15-\$18-\$19-\$18-\$18-Loo-lou-Bio-61u-(3")
- 44()Htb:Pro-Res-Ale-Arg-Lya-Tyr-Lya-Gly-15')
- (5')519-Ann-Lys-Lys- :

8-816-816-77p-816-376-100-100-816-610-63') 66')816-870-866-816-376-190-757-190-619-65')

- (8) Bly-Res-Lys-Lys- :
  - 8-les-les-818-618-637
- (4,)\$!a-6.co-yec-y!a-yla-fla-fla-gla-fla-(2,)
- (8) 619-den-lys-las- :
- R-Typ-Lys-Cly-Cly-Sen-lys-Lys- : X W R-Cly-Gly-Sen-Lys-Lys-

《武本。(Y)と(Y)、(T)と(4)、(F)と(5)は 整理輸售しているものとする)で象わされるいず れかのペプチドである』。

以上述べたように、本義明では、ブタの語から 抗CNF-23抗血液をも用いた日1A系を接続に CNFウォミリーに属する新機ペプチドの単離・ 関連を行った結果、抗CNF-22抗血液に対し免 機能性を示すペプチドを、単一で純粋な状態まで 機能性を示すペプチドを、単一で純粋な状態まで 機能することに成功し、さらにこのペプチドの構 激解的を行ったところ、このペプチドがCNF〜 20をC-実施部分に含むアミノ酸532残暴よりなり 利度作用及びナドリウム利尿作用を有するペプチ ドであることを見いだし、本業期を突然した。

以下、実施的により本発明を詳細に影響する。 実施的1 次のトー22所本項の作業及び R1A系の複数

# A. <u>MCNP-IIMARON</u>

5 mgの化学合成したCNP-22とウン・サイログロブリン(sbyrogiobalic, シグマ社報) 15 mgを を 3 mgの8, imリン類バッファー(ch 7, 4)に容解し、 この溶液に100mgの 5 %がルタルアルデモドを加 え、Cでで30分額獲得することにより、CNP-

(Sys\*\*) CNター22を連載当するCを再いて分 減・車難した。

次に、2のようにして作製した!!\*\*でうべルした (195\*) [ CNP-92と実施領1、Aで作製した技術 (#)71-4)を用い日1Aの茶を以下に示す 方法で得答した。

すなわち、R(A来のbufforは、86mm 8aC)、8.13 3 Triscol.192、35mmspta、0.05% 8am。3.13を ポストラン 7-40、0.25%38m(Nースチルマレイ レイミド(Southylasiciaism)処理したもの)を含 む、50mmりン機バッファー(ph 7.4)を用いた。ス タンダードCNPー22溶液またはアッセイサンブ ル(100点)と物配した方法で作製した気体が171-4(60000倍激更したものを100点)を加え、4 で で24時間反応する、24時間後、トレーサー(112) でラベルした(120mm) CNPー22)100点を加え 4でで36時間反応した後、ポリエチレングリコー ルを加え、生じた沈微のラジオアタティビティ (radiosociais) 次 を200mm カセンター4260-668。 8(5km)で液定した。 22をサイクのグロブリンに競合させる。次に、この溶液を水(530 ml) に対しる面、80mm 9cm に対しる面、80mm 9cm に対しる面、80mm 9cm に対し 2個連続することにより、反応物味中の過剰の姿 及び試験を除いた。さらに、この反応後に80mmの 301を含む50mmリン酸パッファーを加え、全量を 12mmとした効、需要のFranceがカーコンブリート アジェバントを加えエマルジョンを形成し、これ をウサギ(Yex 3maiand 8hite) に20日おきに続り 能した姿することにより、低くパアー23所産機を 構た。

なお、このようにして得た例CNP-23的意識は #171-4と称名した。

### B. RIANOME

まず、 { 799° } CNP-22 (CNP-33のN - 未確にタイロシン機器(797) を行取したペプチ ド) を化学会成し、このN-未確797機器にあ1985年 もの方法(81985年, A. et al., Blockee, Bloskye, 825. Commun. 125. 248-255, 1985) を用いて 1\*\*\*を構入し、1188でラベルされた20001045

この下1A系を用いると、1~1051\*xo1/tobsの CNP-22が機能でき、接棒#371-4 のαーAN P、p BNP-28に対する変変機機(crossraactivity) は、それぞれ6.615%、8.46%であった。

# XXXX CN2-3104X H&

アカタ30円から40%の施を摘出し、範囲した後、アロテアーゼを不溶化するために2容量の機器水で多分類処理する。物却後米粉数を最終遅落が1 Mになるように加え、この超機をボリミロンミをサーを用いてネモジナイズする。次に、このかモジオイズする。次に、このかモジオイズする。次に、このかモジオイトを減り分類することにより、洗漉暖分と上摘整分に対け、この上摘影分を2011に00% 82888では、(PCSC 8050-95、8111100%の)を用いて機器する、この機器だアセトンを加え(機料機器05%)、生のた対象を進む機件で除去し、上摘を実施機能した。ここで導られた機能器を0.588齢能に密かし、4 類に対けてロー18シリカゲルカラム(1.58 容量、10~5098 598-6-909、60~80%にかけ、カラムに吸離したペプチドを水・アカリエトート(78,68)・15%トリアルタの輸給(284)が、165、10年 るように顕彰した消滅で容出し、この溶出液を濃縮することにより、乾燥業量28gのペプテドを含有する残骸を得た、このうち1/2量を1M野獣に得かし、1M野獣で平衡化したSFーセンドデックスの一部カラム(8・50cm、3×35cm)を用いたイオン交換クロマトグラフィーにかけ、カラムに穀野したペプテドを1M野獣、2×ビリジン及び2州ビリジン一野獣(約3,9)を用いて戦攻溶出した。このようにして得られた各競分は、それぞれ、3P-1。SF-8、SP-8の対と名行け、複雑設施した。本義明におけるCNF-53の情報はこのSP-3前分を出発源料として用いた。なお、約記した81人の茶で抗CNF-23院立権に投資路径を戻すペプテドの後とんどは、このSP-8に含まれていることが判った。

ます、50~8減分(乾燥重要5.2g) モセフォ デックスロー50カラム(fine, 7.5×145cm,ファル デックスロー50カラム)(fine, 7.5×145cm,ファ ルマンア) を用いたゲル減適にかけることにより。 分子繋約(350~5000のペプチド含有額分を軽緩重

逐級機関的稅、液建;40×4/4、機分サイズ: 20×4/ /tate) できらに分割し、各項出級分の旅ぐれた ~20旅生後に対する免疫消耗を概定した。

この綺麗、麗2選に示すように、フラクション餐 ※99-102股が151-113に旅ごNP-22機能構に対 する免疫療性が認められ、これらの影分をそれぞ れ無的強縮數學した。次に、解記に以一52クロフ トのブラグシャン番号111-113の部分(数葉葉葉 8.54()を放しANP放体を磨いたイムノアフィニ テックコマトグラフィー (ごのカラムの作製に際 しては本意理者等の報告に詳細に記載されている。 Sada, S. et al. Bioches. Blophys. Res. Cossum... 149 1855-1852、1887) にかけ、カラムに敬馨し たペプチドを19% CEaCRを含む 1 無跡機容蔑で溶 出し、この海出務分をじーjをカラム(Hi-Fore RF-318, 4.6×250mm, Bio-Red) を用いた連相目PL C (強盛: ],5xx/ain, 溶出機; H.G:CH:CN:10% ?\$4.(\$180:10:1, (\$) 40:50:1(\$/\$), 路边条件: 務出液みと8を用いた直轉構度句数、務出時間; 120ais) で分類・複製し、各径出資分の低CNF

量として2.95。存在。次に、このうち半量(1.45) をセファデックスロー25のカラエ(1):00、7.8×150 ca、ファルマンア)を用い、さらに分配し、名強 出面分を前組したでするを用いて抗これを一部類 ままに対する整備器数を調べた。

この結果、第1回に示すように、近これを一記柄 重適に対し免疫器性を示す感分が2つに弱れ(第 1回、分子量約4000~5000の3両分と分子量約 2000~3000のご避分)。数にNP~20減の者に反 必するペプチェの存在量比は3両分とご取分で約 4:3であった。なお、本発明者もによりすでに 無機・確定したにNP~20はご販分に含まれてい もことが調っている。本発明ではこのお願分を以 下に示す方法できるご需要した。

まず、前距した方法で分割した分子置約4008~ 5000の日面分(蛇線重量740mx)をCM(CR-52。 2.4×53.5cm。 \*baimas)イオン交換タロマド (特出表本:10\*\* ECOCM3.6m も.5)\*GR\*GN-90:10 (\*/\*\*)、溶出液B:0.5% ECOCMB.6m 6.6)\*CR\*GN-50:16 (9/\*)、溶出染件、溶出液人とBを得いた

一22旅遊灣公封する免疫活性を終べた。

1の結構、解3級のの矢印に示す位置に、約CN アー22抗血糖に対し免疫無性を持ち、かつ218mm のUV投収が最大値を示す数分が得られた。

なお、本発明における構製なで得られるC N P ー 59の収費は、アタ幅40kgから約190pma1(700me)で あった。

# 表施致3 CN 2 - 53 C 推進決定

#### A CNF-53071/N-AX2LDMA

変換例2で導たCNF-53の5/4費(約523

143) 老する/機械別自動分析機(Applied Sicsystems
(738/13204)に使し、エドアン分解技により下さ/ 酸一次配列を分析した結果、寒を置に示す結果が 落られ、この結果よりでNF-53のN-末端から
45番目までのする/酸一次配列は以下に示す配列 であると決定した。ただし、この解析で37サイク ル母のドでH-テミノ酸は検出されないことから、 本発明者は、このする/数はレスティン残器と例 定した。

8. Asp-Lev. 978. \*\*\*: - 858 - 787 - 198 - 887 - 878 - (3)
(3) A18 - 318 - 770 - 818 - 878 - 108 - 128 - 818 - 618 - (3)
(4) 818 - 856 - 856 - 818 - 878 - 198 - 797 - 198 - 619 - (5)
(6) 619 - 888 - 198 - 198 - 619 - 168 - 888 - 878 - 118 -

なお、この解析で終サイタル自収機のアアサーア

33の成じNF-33該無溝に対する1分子あたりの 免疫機能を求めたところ、CNF-33の構造をC NF-22をC-末端に含む93碗のアミノ糖残差か らなるペプチャとして求めた機は、CNF-22の それと網帯であった。

以上の解析結果から、本色別者はCNター53の 構造は以下のアミノ酸一次配列で示される解聚ペ アチドであると転論した。

8-422-262-878-88]-822-757-293-887-47**8**-(1)

(8) \$12. \$12-7ro-\$1e. \$rx-lev-Lea-\$1c-61c-(3)

(4) 8(x-210-355-812-358-298-738-298-618-(5)

(6) Gly-8ss-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)

(8) Cya-28e-Cly-Leu-Lya-Leu-Aso-Ara-110-(9)

([0]6]y-Sex-821-Sex-6[y-Lex-6]y-6ys-08

(武中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、(7)と(5) 及び(8)と(18)は東接結合しており、37位と53位 のシスティン残豪(Cys) は分子内で5ー3結合を 形成している。)

#### 

以上のように、本義明では、変ず先に華馨・阿

ミノ酸は検出することはできたが、関定するには 至らなかった。

# B. CNE-SION-ENTELECKIC

CNP-22073/第一次製器の超密性の比較 実施例3のAで変定したCNP-53のN・来端 から45零目までの73/数一次配列を、先に同定 したCNP-22のアミノ数一次配列と比較したと ころ、乗を認に示すように、CNP-53の32番目 から45零目までのアミノ数一次配列は、CNP-22のN-未満から34番目までのアミノ機一次配列 に完全に一致することが到った。

### C CEP-MOLEJENSEE

(chich rectum relayers activitii)

# d. <u>CNP-Sightene-Rikamenees.</u> Ruu

実施例1で作成したストム系を用がくでNFー

定したこれで一般の構造を特異的に認識する紙体を作製し、これを用いた日子 A系を構築した。次に、この日子 A系を指揮に、ブタ酸からこれを一 22以外のこれをファミリーに属する新規ペプチドを探したところ、これを一部とは明るかに異なる 新規ペプチド(これを一部)を無一で純粋な状態までに構動することに変功した。

きらに、このペプチドの構造解析を行い。CNP -58はCNP-38をC-来端に含むアミノ報53巻 表よりなるペプチドであることを明らかにし、このペプチドがCNPファミリーに選する新聞ペプチドであることを聞いだした。

本義明により、CNP-83の構造が明らかにされたことから、今後CNP-83は化学会成また高度伝子操作を用い、大量に入学することが明結になり、これを用いて機・の表理試験を行えば生体内におけるCNP-83の生産的作用を明らかにすることができる。また、第5回に示すにNP-83のアミノ搬一成配列で「番目から32番目の間には、5個のリジン(Lys)務整(7.24,26,30及び31番目)

## **新加平4-74198(9)**

とも傷のアルギニシは18)残薬(3,8,14枚び23姿。 日)が存在していることから、産株内において、 CMを一58はアロセッシング酸素により、これも 福基性アミノ酸液器のCー末端が特異的に切断を 受け、ロバター22以外にCNF-22のN-米線に さらにアミノ繋が付加した機々のペプチド類(例) 支援、第3回に示すて31酸一次配列でもから終 餐室」 3 から53番買、10から53番目。15から53番 8、25から83餐日及び27から52番日に対応する ペプチャ)な変数され、これらが生体物において、 CNP-83, CNP-22とは異なった生理療性を 景す可能性が高い。これらの可能性は、本発明で とおと、33の構造が弱らかにされたことから、こ れるのパプチド煙を化撃合放または遺伝子操作者 用いて作製し、これらを用いて種々の藁蓬試験を 行えば彼かめることができる。さらに、CNP-53のアミン競ー次配列の情報から、CMP+53に 対応するDNAプローブを作製し、これを用いて CNP-SIをコードしている遺伝子及びcDNA を取録・解析すれば、CNF-22, CNF-53の

期駆体タンパクの構造を明らかにすることができる。後って、以上のことから、本発明に今後にだ リファミリーに裏するペプテドの集合放機構、生 体内分布、及び生理作用を明らかにする上で、また。これリファミリーに裏するペプテドを販変品 として開発する上で、大いに実数するものである。 よ、「影響の整準な展明)

第1回は、ブタ総からの独出物(ステー当分案をおらにSeptiadex G-50 を用い分离した分子量的1000~8000のペプチド級分)をSeetedex G-25 を果いてさらに構製したときの溶出経過、及び各等分の紙のNF-32板監備に対する機関指揮を示すグラフである。なお、矢切1,2,3,4,5はこのカラムにおける1)bevine serum \*15umin;2)BNP-32、3)BNF-36、4)な一人NF14-28)及び5) neurotensis の溶出位置を示す。

第3器は、第4器は示したお額分を日本-82イオン交換クロマトグラフィーを用いてさらに特製したときの海出鉄器、及び各額分の抗Cドター22

放盘液に対する免疫器性を示す。

糟裂したときの溶出級過を示す。

第3回は、CNP-53の最終課製に高いな盗移 HPLCの物出発達、及び各番分の抗CNP-22 抗物物に対する免疫活性を示す。なか、61 年第3 回のCM-82クロマトグラフィーの溶出資分等等 511-313を1x11-αー入NP 1x15を用いた1\*\*5×2x1(1x)1yクロマトグラフィーにかけ、このカラム に破者したベアチド減分を81-7×1 88-318カラム を用いてさらに複製したよりの冷沈経過を示し、 5) は第3回2 の矢型の位置に増出するベアチド無 分を、213 7954 810 hanx1 カラムを用いてさらに

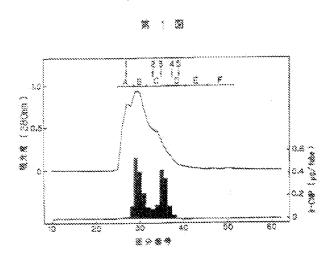
第4回は、CNP-53のエドマン分解性による 各サイクルごとに供するPTH-アミノ機の収率 及びアミノ機能列を示すクラフである。なお、各 アミノ機は一文字変配で表され、お上枠はCNP 一53のエドマン分解における30~45サイクル目の ド丁円-アミノ機収率を4倍に拡大し、表示した ものである。

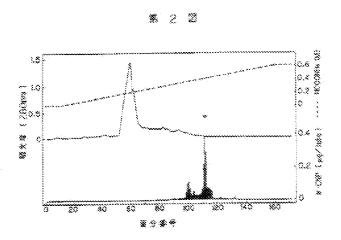
第5器は、CNP-53のN-末端から45番目ま

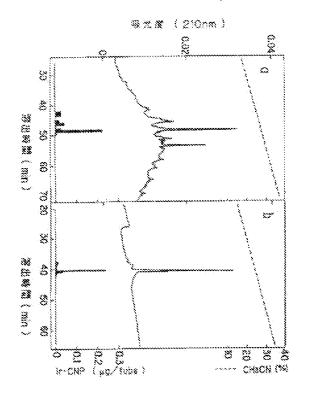
でのフミノ酸…次配列とCNP-22のアミノ酸… 次配列の機関性を示す返である。

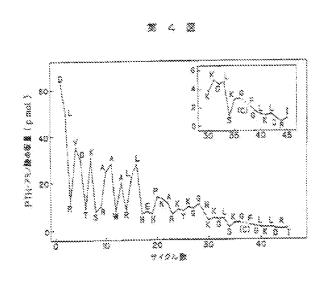
第6額は、CNF-53を含む系統体をコードするcDNA配列を示す業である。

特殊出職人 松 寒 幕 之 代 瓊 人 弁理士 海 後 参 エ









\*\*

(, si

**S** 

# **第** 5 **3**

app-Leu-Arg-Vol-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ald-Ald-Trp-Ald-Arg-Leu-Leu-Hish

giv-His-bic-veu-viq-vud-fhe-fhe-fhe-gih-gih-veu-fhe-fhe-fhe-gih-veu-get-fhe-

Giy-Cys-Phe-Giy-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-lie-Giy-Ser-Meit-Ser-Giy-Ceu-Giy-Cys CMP-E3
Giy-Cys-Phe-Giy-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-lie-Giy-Ber-Meit-Ser-Giy-Leu-Giy-Cys- CMP-22

## **38** 6 ₩

											~ 3	43 (	(CAO)	CAGC	ceec	acca	-1,27
-128	cac	XGCX	CTGG	GACT	೦೯೭೦	ರಂಧಾ	CACC	GCAG	ದಲ್ಲಿ	GCCA	.ctct	ccrc	cace	erco	ctro	CCAG	~64
~6.3	TOTACCOGCEGGCCCCTTCACCTCTCTGCCGCCGATCTGCGCCCCCACACGCC														0,000 1,5	-1	
1	Met ATG	Kis CAC	teu CTC	ser rcc	Gln C&G	Leu CTG	Lev CTG	Ala GCC	Cys TGC	Ala GCT	Leu CTO	Leu CIG	Leo CTC	XOG XOG	CYC	Leu CTC 32	**
4 <b>9</b>	Ser TCG 33	Crc	Arg CGG	CCC	Ser TCC	Glu GAA	Ala GCC	Lys AAG	CCC Exo	Gly GGA	Ala GCG	Pro	CCC Exc	Lys AAG	GIC Ami	200 200 88	9.5
37	Arg CGA	Thr ACT	003 210	Pro	GGG	GAG GAG	Glu GAG	Val GTG	Ala	Glu GAG	7r0 200	Gla	Ala GCT	Ala GCG	Gly GGC	630 630	184
145	Gly GGT 65	Gin CAG	Lys AAG	lys Mag	eec eec	Asp GAC	Lys AAG	Th: ACT	CCT	eee Gly	GGC	GGT	ggc ggc	300 314	Asn AAC	Leu CTC 80	292
193	Lys AAG 81	ශ්රී	GAC	CGG	TOT	CGA	Leu CTG	೦೫೦	೮೦೦	CAC	CRG	cec	GTG	GAC	ACC	AAG 96	240
241	Sex TCT 87	ceé	SCS	SCS	TGG	೦೦೦	Arq CGC	CIT	CIG	CAC	GAG	CAC	ccc	AAC	GCG	CGC	288
289	AAA 113	TAC	RAA	SGA	GGC	AAC	Lys AAG	AAG	GGT	TIG	TCC.	AAG.	ಇಡಧ	138 128	11C Spe	egc egc	336
337	Leu CTC	Lys AAA	Leu CTG	asp Gac	COC	Ile ATC	SSC	Ser TCC	Mei Aig	Ser NGC	GGC	Leu CIG	Sly SSA	Cys TGI	* Tag	TGČ	384
385	ggcg	SCGATCSTSSCGSCGGTGAG 407															